

**VERHALTEN DER NUCLEOSID-5-
TRIPHOSPHATASE-REAKTIONEN
DER LEBERZELLKERNE WÄHREND
DER CANCERISIERUNG DURCH
DIAETHYLNITROSAMIN**

Sigrid Tesmann

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. Büngeler

VERHALTEN DER NUCLEOSID -5- TRIPHOSPHATASE-REAKTIONEN
DER LEBERZELLKERNE WÄHREND DER CANCERISIERUNG DURCH
DIAETHYLNITROSAMIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sigrid Tesmann, geb. Rau

aus Saarbrücken

München 1969



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Schauer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Büngeler
Dekan: Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.1970

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

II. METHODE

Zellkernisolierung

Messung der ATP-ase-Aktivität

III. ERGEBNISSE

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß sich nach Verabreichung der aliphatischen N-Nitrosoverbindung DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA) an Sprague-Dawley-Ratten bei niedriger Dosierung von weniger als 4 mg/kg KG/d in nahezu 100% der Tiere ein Lebercarcinom entwickelt. Die ersten mikroskopisch sichtbaren Frühveränderungen zeigen sich schon um den 35. Tag, wobei eine Vakuolisierung des Cytoplasmas in den acinozentralen Zellen mittels HE-Färbung nachgewiesen werden konnte (GRUNDMANN u. Mitarb. 1962, KRZENCISSA 1968). Zwischen dem 50. und 70. Tag der Cancerisierung wurden Enzymdefektbezirke der Nukleosid-5-Phosphatasen und der Glucose-6-Phosphatase gefunden, die direkt neben der Zentralvene und in der Läppchenperipherie lokalisiert waren. Während die Aktivität an Cytoplasma, Zellmembranen und Gallengängen stark reduziert war, blieben die nukleolären Reaktionen weitgehend erhalten, um erst mit weiterer Cancerisierung abzunehmen. (SCHAUER, 1966).

Ferner wurde in den Enzymdefektbezirken eine Erhöhung des ³H-Cytidineinbaus und in einzelnen Enzymausfallsbezirken auch eine Erhöhung des ³H-Thymidineinbaus mit autoradiographischen Methoden nachgewiesen. (SCHAUER, KRZENCISSA, KUNZE, 1966).

In dieser Arbeit sollen die histochemisch nachgewiesenen Aktivitätsänderungen der Adenosin-5-Triphosphatase speziell des Zellkerns während der Cancerisierung auch biochemisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde Ratten täglich DÄNA in einer Dosierung von weniger als 4 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Die Leberzellkerne wurden nach einer modifizierten Technik von MAGGIO in Rohruckerlösung isoliert und die Adenosin-5-Triphosphatase-Aktivität der Kerne mit Hilfe eines optischen Tests in Anlehnung an FISCHER, SIEBERT und ADLOFF bestimmt.

II. METHODE

Zellkernisolierung:

Die Versuchsserie umfaßt männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten. 75 Tiere erhielten täglich mit dem Trinkwasser 4 mg/kg KG DÄNA, wobei die tatsächlich aufgenommene Menge etwas geringer war, da in den Trinkflaschen der Tiere meist kleine Rückstände waren. Jeweils 8-13 mit dem Cancerogen behandelte Tiere und 10 Kontrolltiere wurden zwischen

dem 51. - 54. Tag

dem 65. - 69. Tag

dem 74. - 77. Tag

dem 90. - 94. Tag

dem 111. - 116. Tag

dem 121. - 123. Tag

dem 140. - 145. Tag

getötet. Die mit Äther narkotisierten Tiere wurden dekapitiert und entblutet. Ihre Leber wurde entnommen und sofort in 0,88 m Rohrzuckerlösung von 4°C gegeben. Bindegewebe und sichtbare Gefäße wurden entfernt. Das Lebergewebe wurde zerkleinert, in wenig 0,88 m Rohrzuckerlösung gewaschen und mit einem feinen Sieb zunächst von der Waschlösung getrennt, anschließend mit einem Porzellanstößel darin verrieben. Das so aufbereitete Material wurde nun in die 20-fache Gewichtsmenge einer wässrigen Lösung gegeben, die im Liter 0,88 Mol Rohrzucker und 1,5 mMol CaCl_2 enthielt. Das Gemenge wurde dann in einem Homogenisator durch 6 Stöße mit einem Teflonstößel homogenisiert und anschließend durch 4 Schichten Musselin filtriert, um restliches Bindegewebe und Gefäße zu entfernen. Je 14 ml des homogenen Filtrats wurde in ein Zentrifugenglas ge-

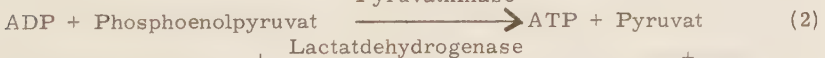
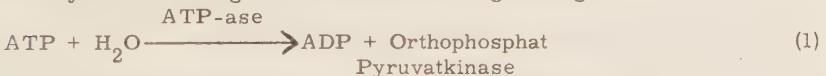
geben und mit 7 ml einer Lösung unterschichtet, die im Liter 2 Mol Rohrzucker und 1,5 m Mol CaCl_2 enthielt. Dann wurde 30 Minuten lang in einer Ultrazentrifuge bei 53000 g zentrifugiert.

Das Sediment hatte die Form eines dünnen Ringes; darüber waren die leicht getrübbte 2,0 m Lösung, dann eine kompakte, rotbraune Masse aus Zytoplasma, zerstörten Zellkernen, Mitochondrien, Erythrocyten usw. und zuletzt die stark getrübbte Ausgangslösung geschichtet. Diese Schichten wurden sorgfältig abgesaugt und die Zentrifugenkappe mit dem Zellkernsediment abgeschnitten. Alle Arbeitsgänge wurden so durchgeführt, daß das Versuchsmaterial bei einer konstanten Temperatur von 4°C gehalten wurde.

Die Kerne wurden schließlich in einer aliquoten Menge aqua bidest, aufgenommen und in einer Thoma-Zeiss-Zählkammer ausgezählt. Ihre Reinheit wurde in einem HE.-angefärbten Ausstrich bzw. auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stichproben überprüft. + Die einfache Art der Zellkernzählung statt einer Bestimmung der DNS-Menge zur quantitativen Relation der gemessenen Enzymaktivitäten wurde auch in anderen Arbeiten erfolgreich angewandt. (Maramatsu et al).

Messung der ATP-ase-Aktivität

Zur Bestimmung der ATP-ase-Aktivität der Kerne hat HOLZER ein Testsystem aus folgenden Reaktionen vorgeschlagen:



Das Maß für die ATP-ase-Aktivität ist hiernach der Umsatz von NADH (3). Reaktionskinetische Voraussetzung ist, daß Gleichung (1) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt mit Gleichung (2) und (3) als sehr schnellen Folgereaktionen. Durch Gleichung (2) wird ATP ständig wieder zurückgebildet; dieses "Prinzip der Konstanthaltung

+ Die elektronenmikroskopische Kontrolle erfolgte freundlicherweise durch Professor Miller.

der Substratkonzentration " (SIEBERT, RACKER) macht das Testsystem von der Kinetik der ATP-Hydrolyse (1) unabhängig. Außerdem werden alle Reagentien (Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, NADH, Lactatdehydrogenase) so hoch angesetzt, daß ihre Konzentrationsänderung im Verlauf der Reaktion praktisch ohne Einfluß bleiben. Wie GATT und RACKER nachwiesen, ist im rephosphorylierenden System (1) und (2) das entstehende Pyruvat ohne stimulierenden Effekt auf die ATP-ase. Unter diesen Bedingungen erweist sich das Testsystem als sehr gut brauchbar, da es über einen großen Messbereich direkte Proportionalität zwischen ATP-ase-Aktivität und NADH-Umsatz gewährleistet.

Den experimentellen Nachweis dazu hat SIEBERT durch einen optischen Test geliefert, der zur Messung des NADH-Umsatzes die Extinktionsabnahme bei $\lambda = 366$ nm benutzt.

Die von ihm angegebenen experimentellen Bedingungen wurden nach einer Testvorschrift der Fa. BOEHRINGER und SÖHNE modifiziert und die Messungen folgendermaßen vorgenommen:

Testansatz

1. Triäthanolaminpuffer (0,1 m; pH 7,6-8,4) bzw.
Diäthanolamin (0,1 m; pH 8,4-9,8)
2. ATP-Lösung:
10 mg ATP, Na-Salz, in 1 ml aqua bidest. lösen.
3. MgSO_4 -Lösung (0,32 m)
4. KCL-Lösung (4m)
5. PEP-Lösung:
5 mg PEP, Cyclohexylammoniumsalz, in 1 ml aqua bidest. lösen.
6. NADH-Lösung:
10 mg NADH, Na-Salz, in 1 ml Aqua bidest. lösen
7. PK: 10 mg Protein/ml
8. LDH: 5 mg Protein/ml

Ausführung:

Meßstrahlung: 366 nm; Testvolumen 3,00 ml; Schichtdicke 10 mm.

Temperatur: 22°C.

Tra-Puffer	(1)	1,92 ml
ATP	(2)	0,20 ml
MgSO ₄	(3)	0,10 ml
KCL	(4)	0,10 ml
PEP	(5)	0,10 ml
NADH	(6)	0,05 ml
Pk	(7)	0,01 ml
LDH	(8)	0,02 ml

Die Reagentien werden in der oben verzeichneten Reihenfolge einpipettiert und gemischt. Nach Stillstand der Vorreaktion wird durch Zugabe der ATP-ase-haltigen Kernsuspension die eigentliche Reaktion des Testsystems gestartet. Da erfahrungsgemäß die Reaktion in den ersten 5 Minuten unspezifisch verläuft, wird die eigentliche Messung erst nach weiteren 5 Minuten begonnen. Die der ATP-ase-Reaktion entsprechende Extinktion wird nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten abgelesen und hieraus die mittlere Extinktionsänderung pro Minute bestimmt.

a.

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der Extinktion von der ATP-ase-Aktivität bei konstantem pH-Wert wurden in einer Meßreihe verschiedene Volumina einer Suspension mit bekannter Anzahl Zellkernen eingesetzt. (vergl. ABB. 1 u. 2).

b.

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit bei konstanter ATP-ase-Aktivität wurde die Messung in sieben verschiedenen Puffergemischen durchgeführt (vergl. ABB. 3), und zwar jeweils zweimal, um aus beiden mittleren Extinktionsänderungen den endgültigen

Extinktionsabfall pro Minute zu mitteln.

c.

In gleicher Weise wie unter b. wurde die Änderung der ATP-ase-Aktivitäten der mit DÄNA behandelten Tiere über einen Zeitraum von 145 Tagen verfolgt. (vergl. ABB. 4 u. 5).

Die Umrechnung der Extinktionswerte in Einheiten (m Mol) der ATP-ase-Aktivität erfolgte nach der Formel:

$$\frac{U}{ml \text{ Probe}} = \frac{\Delta E / \min \times 3,00}{3,3 \times 1 \times 0,5} = \Delta E / \min \times 1,82$$

Zur Vergleichbarkeit werden alle Ergebnisse auf jeweils eine Million Kerne bezogen.

III. ERGEBNISSE

Zu a: Abb. 1 zeigt die Extinktionsänderungen über einen Zeitraum von 110 Minuten. Nach kurzer Inkubationszeit (0-5 min) verlaufen die Kurven bis etwa 30 Minuten linear. Mit steigender Enzymmenge treten jedoch zunehmend Abweichungen von der Linearität auf, die sich bei schnellerem Verbrauch von NADH durch die raschere Annäherung an den Reaktionsstillstand deuten lassen. Die Proportionalität zwischen NADH-Umsatz und Reaktionszeit ist im Zeitintervall 5-10 min am besten erfüllt.

Nach Abb. 2 ergibt sich direkte Proportionalität zwischen Umsatzgeschwindigkeit ($\Delta E / \min$) und Enzymmenge ebenfalls für dieses Zeitintervall; weswegen es allen Messungen zugrunde gelegt wurde.

Zu b: Bei sämtlichen Untersuchungen wurde in den Zellkernen von Kontrolltieren und behandelten Tieren ATP-ase-Aktivität nachgewiesen. Die Höhe der ATP-ase-Aktivität ist vom pH-Wert abhängig. Aus zwei Versuchsserien (mit 33 bzw. 24 Kontrolltieren), die in ihren Meßwerten

nur durchschnittlich ca. 3% voneinander abwichen, ermittelte sich ein Kurvenverlauf (ABB. 3), der von pH 7,6 zum Maximum bei pH 8,4 um ca. 22% der ATP-ase-Aktivität ansteigt, von da bis pH 9,4 geringfügig, dann etwas steiler um 15% bis pH 9,8 abfällt. Bei pH 10,1 ist keine Aktivität mehr festzustellen. An der Nahtstelle der Puffer Triäthanolamin und Diäthanolamin (pH 8,4) waren die ATP-ase-Werte nahezu identisch.

Zu c: Bei den mit DÄNA behandelten Tieren zeigt sich im Wesentlichen die gleiche pH-Abhängigkeit der ATP-ase-Aktivität mit einem breiten Maximum zwischen pH 8,4 und 8,7 (ABB. 4). Es wurde festgestellt, daß die Aktivität der Kontrolltiere starken Schwankungen zwischen den Extremwerten von 59 und 361 m μ Mol unterlagen. Dagegen zeigten die behandelten Tiere wesentlich geringere Schwankungsbreiten, z.B. lagen nach dem 121.-123. Tag die Aktivitätswerte zwischen 44 und 97 m μ Mol. (Zahlenwerte für pH 8,4 sind in Tabelle 1 zusammengestellt.)

Insgesamt verringern sich die mittleren Aktivitätswerte im Verlauf der DÄNA-Behandlung bis zu einem Minimum am 90.-94. Tag (360-376 DÄNA/kg KG) und steigen dann wieder langsam an (ABB. 5). Die Versuchsreihe mußte nach dem 145. Tag beendet werden, da sie mit fortschreitender Carzinogenese immer unzuverlässigere Werte lieferte.

IV. DISKUSSION

Um die molekularbiologischen Ursachen der Tumorentstehung aufzuklären, wurden in zahlreichen Tierversuchen mit histologischen, histochemischen und biochemischen Methoden die Unterschiede zwischen Zellen von gesundem Gewebe und Zellen von Tumorgewebe untersucht. Neben morphologischen Veränderungen wurden besonders auch Ausfälle von zellspezifischen Funktionen beobachtet. (Siehe Tabelle II).

Zur Auslösung solcher Krebserkrankungen im Tierexperiment wurde anfangs durch Bestreichen der Haut mit bestimmten Canzerogenen (z. B. Teer) ein Hautkrebs ausgelöst, von dem ausgehend auch andere Organe über Metastasen mit Krebs befallen wurden. Mittlerweile hat man in bestimmten chemischen Verbindungen Mittel gefunden, die nach Injektion oder oraler Verabreichung in geeigneter Dosierung mit nahezu 100% Angehrate an bestimmten Organen lokalisiert einen Tumor auslösen.

Eine Gruppe solcher organspezifischer Canzerogene sind die Dialkylnitrosamine, R_2N-NO , über deren Wirkungsweise systematische Untersuchungen vorliegen. (MAGEE, BARNES 1956), (DRUCKREY, PREUSSMANN, SCHMÄHL, MÜLLER 1961), (DRUCKREY, PREUSSMANN, SCHMÄHL, MÜLLER 1962), (DRUCKREY, PREUSSMANN, SCHMÄHL, IVANKOVIC, BLUM, AFKAHM 1963) (DRUCKREY 1963), (DRUCKREY, PREUSSMANN, IVANKOVIC, SCHMÄHL 1967) (DONTENWILL, MOHR 1961). Sie erfahren im Organismus eine chemische Umwandlung, für die folgender Mechanismus postuliert wird; Nach Hydroxylierung am α -Kohlenstoff durch eine unspezifische Hydroxylase erfolgt eine spontane Desalkylierung zum Alkyldiazohydroxyd, das nach Wasserabspaltung zum Diazoalkan führt. Dieses wirkt unter N_2 -Abspaltung alkylierend auf Proteine und Nukleinsäuren, wobei die Alkylierung der Nukleinsäuren fast ausschließlich am Stickstoff des Guanin in 7-Stellung erfolgt; (MAGEE 1956) (MAGEE, VANDEKAR 1958), (MAGEE, FABER 1962) (MAGEE, HULTIN 1962), (MAGEE, LEE 1964), (MAGEE 1963), (MAGEE, SCHÖNTHAL 1964); daneben werden (nach MAGEE 1963) auch andere Zellkomponenten alkyliert. Durch Einführung einer Alkylgruppe am Guanin ist eine irreversible Änderung der DNS eingetreten. Dadurch ist die Basenpaarung der m-RNS beeinträchtigt, was dazu führen kann, daß Teile der Basensequenz nicht redupliziert werden. Da die Synthese sämtlicher Proteine durch die Basenfolge der DNS

genetisch festgelegt ist, dürfte die fehlende Reduplikation der Nucleinsäuren dazu führen, daß bestimmte Proteine nicht mehr synthetisiert werden. Die Mutation kann sich als Verlustmutation auswirken (KARLSON) und dadurch zu den angegebenen Funktionsausfällen führen.

Untersuchungen an Lebergewebe von Ratten, bei denen durch Verabreichung von DÄNA ein Lebercarcinom hervorgerufen worden war, haben mit histochemischen Methoden unter anderem auch Enzymausfälle der ATP-asen der Leberzellkerne ergeben (KRZENCIESSA 1968). (KUNZE 1968). Da aus früheren Untersuchungen eine stark toxische Wirkung von DÄNA bei hoher Dosierung bekannt war, wurde auch die Frage geklärt, ob es sich bei den Enzymausfallbezirken nicht um einen toxisch bedingten Enzymverlust handelt. In Stopversuchen wies KRZENCIESSA 1968 noch Wochen nach Absetzen des niedrig dosierten DÄNA Enzymausfälle nach, die also nicht, wie nach Verabreichung anderer toxisch wirkender Substanzen (z.B. Thioacetamid) durch regenerationsfähige Leistung des Zellkerns ausgeglichen werden. Auch eine Inaktivierung der ATP-ase durch unmittelbare Einwirkung des DÄNA kann hiernach ausgeschlossen werden. Bei einer Dosierung höher als 7 mg/kg KG/d, bei der erstmals toxische Wirkungen beobachtet wurden, ergab sich gleichzeitig eine Erhöhung der Serumfermente SGOT, SGPT und SDH gegenüber Kontrolltieren. Unterhalb einer Dosis von 4 mg, die auch für die vorliegende Untersuchung verwendet wurde, wurde dagegen keine Erhöhung beobachtet. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß DÄNA in dieser Dosierung ausschließlich canzerogen wirkt. Die histochemische Methode des Enzymnachweises an Lebergewebe (nach WACHSTEIN und MEISEL) in einer Modifizierung von SCHUBERT und RINNEBERG wurde einer eingehenden Prüfung unterzogen. Dabei konnten systematische Fehlerquellen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, die in Adsorptions- und Diffusionsvorgängen der an der Nachweisreaktion beteiligten Ionen anzunehmen sind, und das beobachtete histochemische Bild gegenüber den tatsächlichen Enzymaktivitätsverteilungen verschieben.

Darüber hinaus ist eine quantitative Erfassung der Enzymausfälle nicht hinreichend möglich. Die vorliegende Arbeit ging daher dazu über, Zellkerne während der Cancerisierung des Lebergewebes vom Cytoplasma zu isolieren, auf biochemischem Wege die ATP-ase-Aktivität der Zellkerne zu bestimmen und mit derjenigen von gesundem Lebergewebe zu vergleichen.

Die Beobachtung, daß die ATP-ase-Aktivitäten der Zellkerne von Kontrolltieren stark variieren, ließ zunächst an Verunreinigung der Fraktionen mit Cytoplasma und anderen Zellpartikeln denken; Schwankungen, die aus der Löslichkeit der ATP-ase in wässrigem Medium resultieren konnten, wurden dadurch weitgehend ausgeschaltet, daß das Zellmaterial unter stets gleichen Bedingungen (Temperatur, Kernmenge, Suspensionsvolumen) aufgearbeitet wurde. Für die Richtigkeit der schwankenden Meßergebnisse bietet eine Arbeit von TEWARI und BOURNE eine weitere Stütze. Die Autoren fanden in histochemischen Untersuchungen an Ganglienzellen im Zellkern sehr unterschiedliche ATP-ase-Konzentrationen; manche Zellkerne waren völlig ATP-ase negativ, andere Zellkerne enthielten einen Nukleolus, der $\frac{4}{5}$ des Kernvolumens einnahm und eine starke ATP-ase-Aktivität aufwies. In diesem Stadium waren zwischen Nukleolus und Zellkernmembran sowie im Cytoplasma ATP-ase-aktive Granula festzustellen. Diese mannigfachen Zellkern-typen, stellen mit ihren verschiedenen, örtlich fixierten ATP-ase-Aktivitäten nach der Interpretation von TEWARI und BOURNE aufeinanderfolgende Verteilungsstadien bei der Synthese der ATP-ase im Nukleolus dar. Man kann schließen, daß je nach dem, welcher der aufgeführten Zellkerntypen überwiegend vorliegt, biochemisch unterschiedlich hohe Aktivitätswerte gemessen werden. Es fällt dabei auf, daß die ATP-ase-Aktivitäten der mit DÄNA behandelten Tiere weit weniger schwanken, als die der Kontrolltiere.

Die Zellkernisolierung aus der Leber behandelter Tiere ist einer Einschränkung unterworfen, die methodisch bedingt ist. Einmal konnten riesige Kerne mit sog. Kernödem, oder Kerne mit besonders hoher Ploidiestufe, wie sie von GRUNDMANN im frühen Stadium der DÄNA-Behandlung an histologischen Schnitten beobachtet wurden, unter den isolierten Kernen nicht festgestellt werden. Die Ursache hierfür wird darin gesehen, daß bei der mechanischen Aufarbeitung des Lebergewebes gerade die blasigen, aufgetriebenen Zellkerne zu Grunde gehen. Zum anderen können sog. primäre Krebsinseln, sehr kleine, dichtstehende Zellkerne, die sich nach Verabreichung von 225-675 mg/kg/KG bei der niedrigen Dosierung von 4-5 mg pro Tag in zunehmendem Maße bilden (GRUNDMANN), unter den experimentellen Bedingungen nicht mehr zur Sedimentation gebracht werden. Es werden also nur Kerne oberhalb eines bestimmten spez. Gewichts isoliert, die keinen repräsentativen Querschnitt sämtlicher im Gewebe vorhandener Zellkerne darstellen. Es können daher mit dieser Methode geringfügige Enzymdefekte nicht erfaßt werden.

Dennoch war zwischen dem 51. und 94. Tag der Cancerisierung ein deutlicher Aktivitätsrückgang der ATP-ase gegenüber Normaltieren zu verzeichnen. Diese Aktivitätsverluste entsprechen den Enzymdefektbezirken, wie sie nach Verabreichung gleichen Canzerogens bei gleicher Dosierung im gleichen Zeitintervall histochemisch nachgewiesen wurden. (KRZENCIESSA, 1968), (KUNZE, 1968).

Da, wie vorher diskutiert, der Enzymverlust nicht auf die toxische Wirkung von DÄNA zurückzuführen ist, und eine unmittelbare Inaktivierung des Enzyms durch DÄNA ausgeschlossen wird, muß angenommen werden, daß durch die Alkylierung von DNS und RNS auch das die ATP-ase determinierende Gen bei einer steigenden Anzahl der Leberzellen irreversibel geschädigt worden ist und dadurch der zunehmende Enzymverlust verursacht wurde.

Der überraschende Anstieg der Enzymaktivität nach etwa 94 Tagen kann unter einem anderen Aspekt gedeutet werden. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von PAPADOPULU 1967 an Rattenlebertumoren von Bedeutung, die ebenfalls durch DÄNA hervorgerufen wurden. In diesen Experimenten wurden histochemisch ebenfalls ATP-ase-Ausfälle bzw. reduzierte ATP-ase-Aktivitäten oder bei einigen Tieren auch eine besonders starke ATP-ase-Aktivität festgestellt. Ähnlich fanden MILLER und GOLDFEDER 1961 bei vergleichenden Untersuchungen an Leberzellen und Mammatumorzellen der gleichen Maus in den Tumorzellen höhere ATP-ase-Aktivitäten, als in den Leberzellen. SCHAUER fand an den Nukleolen von Mastocytozellen eine hohe Aktivität der Nukleosid-5-Triphosphatasen. An anderen Tumorzellen und verschiedenen normalen Organzellen war die Aktivität des gleichen Enzyms wesentlich niedriger. Nach einer These von JAKOB und MONOD unterliegt die Synthese von Proteinen der Regulierung von Repressormolekülen, die von spez. Regulatorgenen erzeugt werden. Es ist naheliegend, daß sowohl Strukturgenen wie Regulatorgenen alkyliert werden können. Durch die Mutation des Regulatorgens ist keine dem Bedarf angepaßte Steuerung der ATP-ase-Synthese mehr möglich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Cancerisierung des Lebergewebes wurde Sprague-Dawley-Ratten täglich mit dem Trinkwasser 4 mg/kg KG DÄNA verabreicht.

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zusammen mit Kontrolltieren getötet. Leberzellkerne wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugierung in Rohrzuckerlösung isoliert.

Die ATP-ase-Aktivität der Leberzellkerne wurde biochemisch mittels eines optischen Tests bestimmt, der näher erläutert wird.

Die mit DÄNA cancerisierten Tiere zeigten bis zum 94. Tag der Behandlung eine sinkende ATP-ase-Aktivität der Leberzellkerne.

Nach weiterer DÄNA-Behandlung bis zum 145. Tag nahm die ATP-ase-Aktivität wieder langsam zu.

Die Befunde wurden an Hand der einschlägigen Literatur diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) BUSCH , H. LANE M. ADAMS, H., De BAKEY, M. MARAMATSU, M.
Cancer Research 25 (1965)
- 2) BUSCH , H., STARBUCK, W., DAVIS, J.,
A Method for Isolation of Nuclei from Cells of Walker
256 Carzinosarkoma.
- 3) DONTENWILL, W.: Die organotrope Wirkung der Nitrosamine
Z. Krebsforschung 65, 165 (1962)
- 4) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D., MÜLLER, M.:
Chemische Konstitution und carzinogene Wirkung bei Nitrosaminen
Naturwissenschaften 48, 134 (1961)
- 5) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D., MÜLLER, M.,
Erzeugung von Magenkrebs durch Nitrosamide an Ratten
Naturwissenschaften 48, 165 (1962)
- 6) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R. , SCHMÄHL, D., MÜLLER, M.,
Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten mit N-N-Dibuthylnitrosamin
Naturwissenschaften 49, 19 (1962)
- 7) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., BLUM, G.,
AFKAHM, J.,
Erzeugung von Carcinomen der Speiseröhre durch unsymmetri-
sche Nitrosamine.
- 8.) DRUCKREY, H.,
Chemische Konstitution und carzinogene Wirkung von Nitrosaminen
Erste Konferenz über N-Nitrosoverbindungen und Lactone
September 1963
- 9.) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANCOVIC, S., SCHMÄHL, D.,
Organotrope carzinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-
verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforschung 69, 103, (1967).

- 10) FISCHER, F., SIEBERT, G., ADLOFF, E.
Charakterisierung von zwei ATP-asen in Schweinenieren-Zell-
kernen.
Biochem. Zeitschrift 332, 131, (1959)
- 11) GATT, S., RACKER, E.,
J. Biol. Chem. 234, 1015 (1959)
- 12) GRUNDMANN, E.,
Die Krebsentwicklung als intrazelluläres Problem, dargestellt
am DÄNA-Krebs der Rattenleber.
Aus Mitteilungsdienst GBK 12, 2
589 (1962)
- 13) HOLZER, H., HAAN, J., SCHNEIDER, S.,
Biochem. Z. 326, 451 (1955)
- 14) JACOB, F., MONOD, J.,
Genetic Regulatory Mechanism in the Synthesis of Proteins
J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
- 15) KRZENCISSA, S.,
Dissertation 1968
- 16) KUNZE, E.,
Dissertation 1968
- 17) KARLSON, P.,
Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart 1964
- 18) MAGGIO, R.,
Studies on Isolated Nuclei
J. Cell. biol. 18, 267 (1963)
- 19) MAGEE, P. N., BARNES, J.M.,
The Produktion of malignant primary hepatic tumours in the
rat by feeding Dimethylnitrosamin
Brit. J. Cancer 10, 114 (1956)

- 20) MAGEE, P.N., : Toxic liver Injury,
The Metabolism of Dimethylnitrosamine
Biochem. J. 64, 676 (1956)
- 21) MAGEE, P.N. VANDEKAR, M., : Toxic Liver Injury.
The Metabolism of Dimethylnitrosamin in vitro
Biochem. J. 70, 600 (1958)
- 22) MAGEE, P.N. , HULTIN, T., : Toxic Liver Injury and
Carcinogenesis.
Methylation of Proteins of Rat Liver Slices by Dimethylnitrosamine
in vitro.
Biochem. J. 83, 114 (1962)
- 23) MAGEE, P.N. LEE, K.X.
Akylation of Ribonucleic acid of Rat Liver by Dimethylnitrosamine
and n-Buthyl-Methylnitrosamine in vivo.
Biochem. J. 91, 35 (1964)
- 24) MAGEE, P.N. , SCHOENTHAL, R.,
Carcinogenesis by Nitrosocompounds
Brit. med. Bull. 20, 102 (1964)
- 25) MARAMATSU, M., SMETANA, R. and BUSCH, H.,
Quantitative Aspects of Isolation of Nucleoli of the Walker
Carcinosarcoma and Liver of the Rat.
Cancer Res. 23, 510 (1963)
- 26) MILLER, L.A. and GOLDFEDER, A.,
Camparison of ATP-ase Aktivity of nuclei and mitochondria from
mouse mammary adenocarcinoma.
Cancer Res. 21, 64 (1961)
- 27) OKAMURA, N., BUSCH, H.,
Base Komposition of high molecular Weight nuclear RNA of
Walker Tumor and Liver of the Rat.
Cancer Research 25, (1965)

- 28) SCHAUER, A.,
Die Mastzelle
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1964
- 29) SCHAUER, A., KUNZE, E.,
Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen
während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin
Z. Krebsforschung 70, 252 (1968)
- 30) SCHAUER, A.,
Histochemische und biochemische Untersuchungen bei der Canceri-
sierung mit Diaethylnitrosamin an der Rattenleber.
Verh. d. dtsh. Ges. f. Pathologie, 50. Tagung
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1966)
- 31) SCHUBERT, H.C.F., und RINNEBERG, H.
Der histochemische Nachweis von Adenosintriphosphat-spaltenden
Enzymen bi ph 7,2 in menschlichen Knochenmarksausstrichen.
Blut VIII, 282 (1962)
- 32) TEWARI, H.B., BOURNE, G.H.,
The Histochemistry of the Nucleus and Nucleolus with Reference
to nucleo-cytoplasmic Relations in the Spinal Ganglion Neuron of
the Rat.
Acta.histochem. 13, 323 (1962)
- 33) WACHSTEIN , M., und MEISEL, E.,
The histochemical distribution of 5-Nukleotidase and unspecific
alkaline phosphatase in the testide of various species and in two
human semninomas.
J. histochem. Cytochem. 2, 137 (1954)

TABELLE I

Tabellarische Aufführung der Werte von Kontrolltieren und mit DÄNA behandelten Tieren. (Die Werte geben die umgesetzten Millimikromole an Substrat=ATP bei einem pH-Wert von 8,4 an).

KONTROLLTIERE:

<u>Serie I</u>	<u>Serie II</u>
99	140
112	120
125	66
138	74
107	151
142	131
149	91
214	99
288	165
175	250
65	170
145	361
104	83
143	70
76	88
70	94
60	147
87	212
78	99
59	81
180	84
131	92
184	82
175	112
	131
	183
	152
	72
	85
	184
	123
	165
	178

DÄNA-TIERE:

51. - 54. Tag

123
138
105
135
95
86
88
147

65. - 69. Tag

134
132
99
75
125
170
116
149
58
150
135

74. - 77. Tag

65
56
94
54
69
64
90
121
132
109
75
89

90. - 94. Tag

46
69
79
113
72
73
73
57
61

111. - 116. Tag

53
64
73
59
65
79
98
106
93
101
62
70
60

121. - 123. Tag

78
74
97
44
70
68
64
81
85
79
85

141. - 144. Tag

64 150
85 136
72 126
93 88
90 93
95 87
64

TABELLE II

Weil'scher Antigenverlust

Rückgang der aeroben Zellatmung und Umschlag in die anaerobe Atmung.

Verlust der Induktionsmöglichkeit der Tryptophanpyrrolase

Verlust der Induktionsmöglichkeit der Tryptophanoxygenase

bzw. der Tyrosin-2-Oxyglutarat-Transaminase

Verlust der Glucose-6-Phosphatase

" " Glycerophosphatdehydrogenase

" " Cholin oxydase

" " Uricase

" " Thymidinreduktase

" " Uracilreduktase

" " Glutaminatdehydrogenase

" " Threonindehydrase

" " Serindehydrase

" " Prolin oxydase

" " Phenylalaninhydroxylase

" " Arginase

" " Ornithintranscarbamylase

" " Fruktose-1, 6-diphosphatase

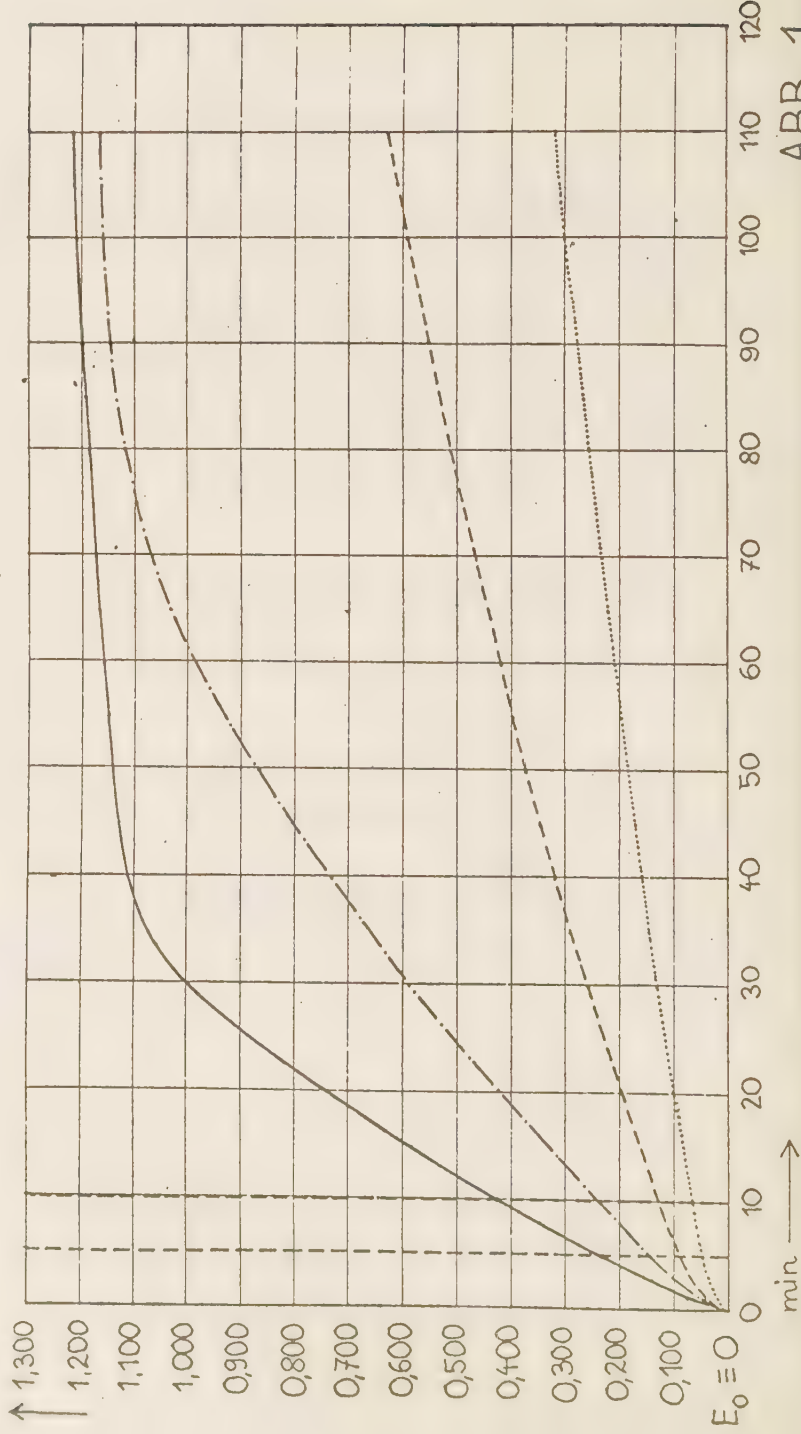
" " dCMP-Deaminase

MESSUNG BEI PH-WERT 9,4

- 0,1 ml KERN SUSPENSION
- - - - - 0,2 ml KERN SUSPENSION
- · - · - 0,5 ml KERN SUSPENSION
- 1,0 ml KERN SUSPENSION

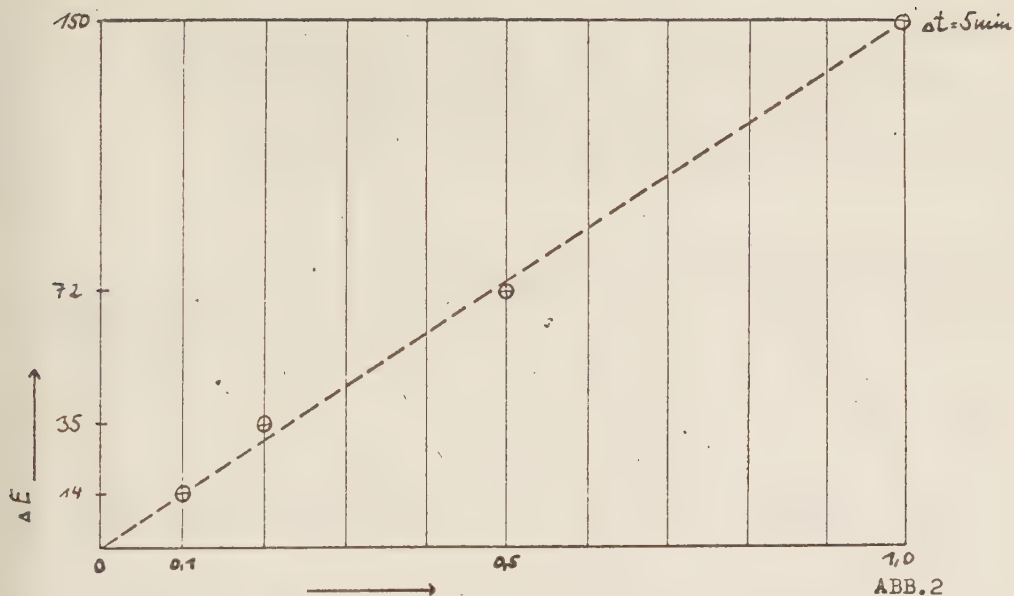
1 ml KERN SUSPENSION = 3,6 MILL. KERNE

ΔE 336 nm

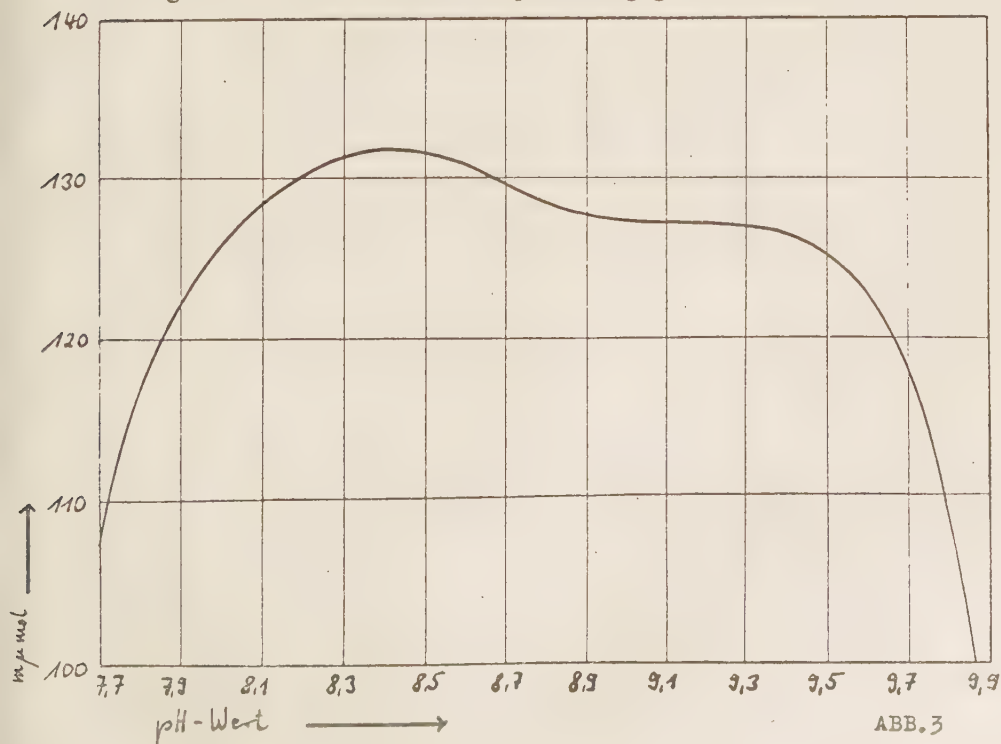


min →

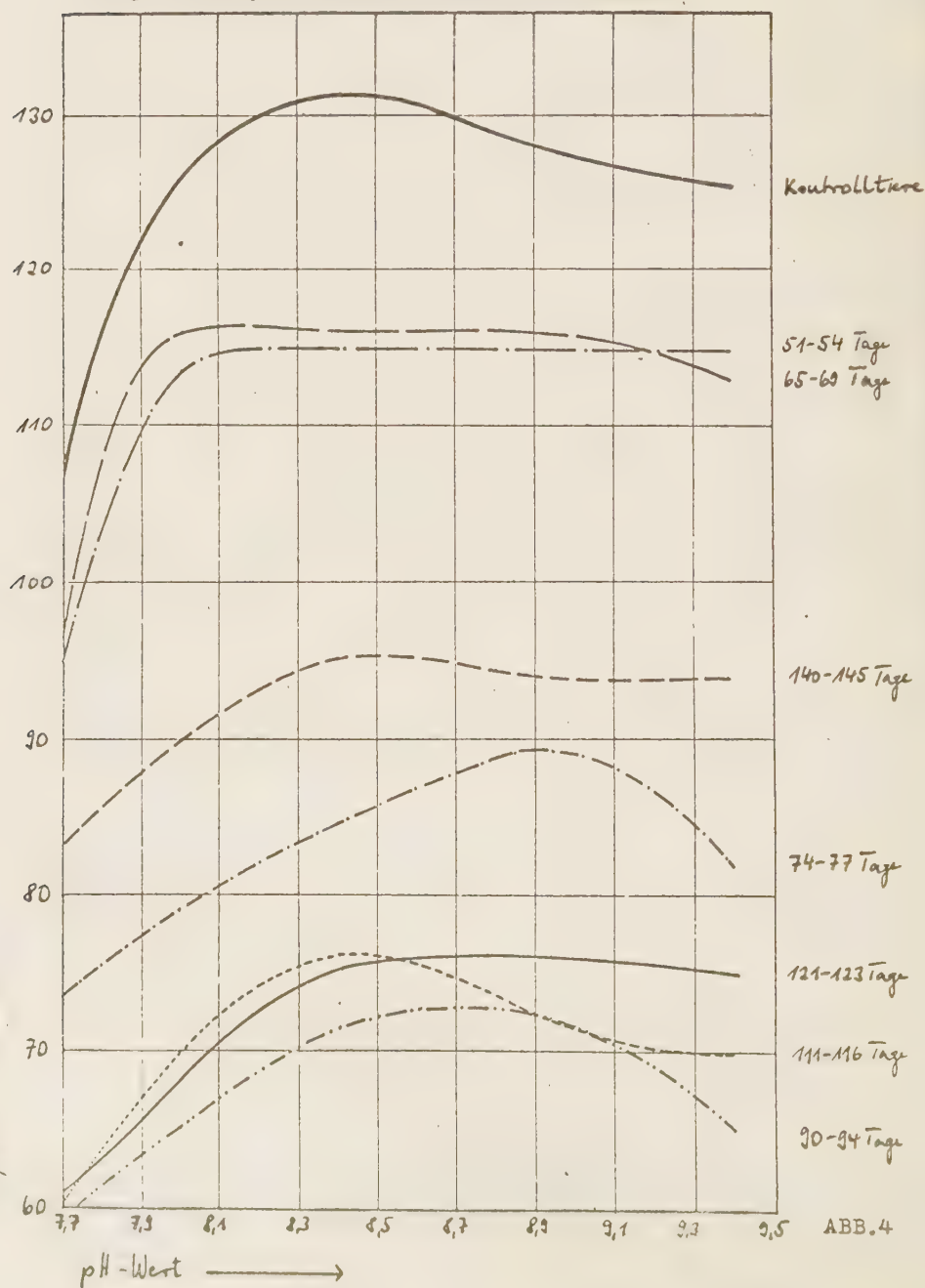
ABB 1



Umgesetzte Mikromillimole an Substrat (ATP) pro Minute
bezogen auf 1 Mill. Kerne in pH-Abhängigkeit:



Vergleich zwischen ATP-ase Aktivität der Leberzellkerne
 von kontrolltieren und solchen Tieren, denen bis zu 145
 Tagen Diäthylnitrosamin verabreicht wurde:



ATP-ase Aktivitäten bei $\text{pH} = 8,4$ im Verlauf der Behandlung
mit DÄNA über einen Zeitraum von 145 Tagen

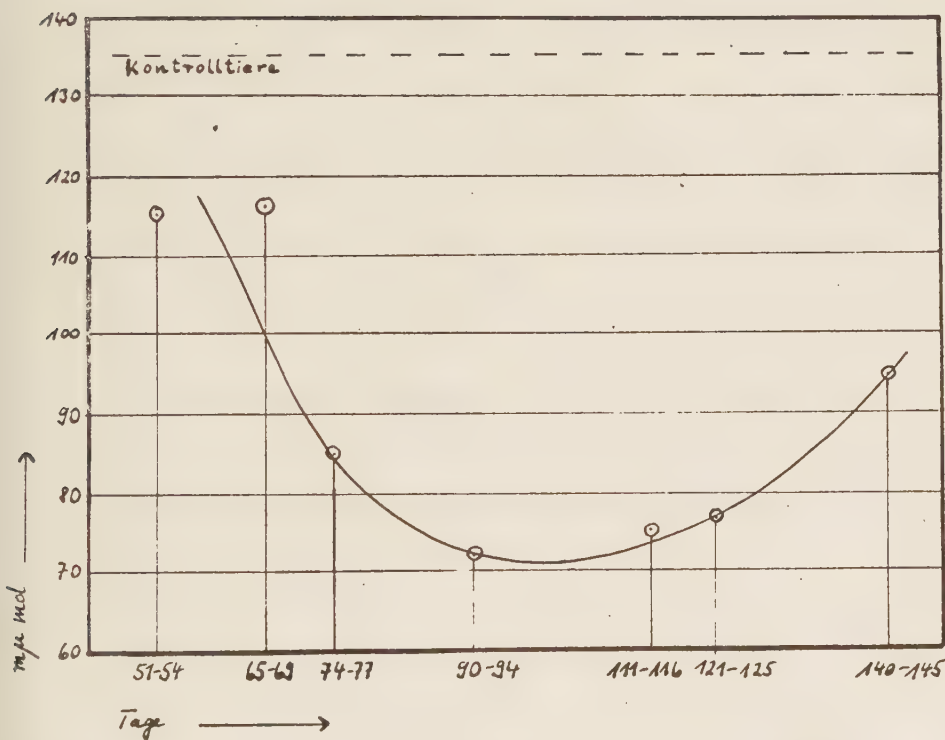


ABB.5

LEBENS LAUF

Am 20. November 1943 wurde ich als Tochter des Dipl.-Ing. Otto R a u und dessen Ehefrau Hedda, geb. Roth in Saarbrücken geboren.

Von 1950 - 1954 besuchte ich in Zweibrücken/ Pfalz die Volksschule, anschließend bis 1957 das Herzog-Wolfgang-Gymnasium. Nach dem Umzug meiner Eltern nach Lünen/Westf. besuchte ich von 1957 - 1963 den altsprachlichen Zweig des Stadt-Gymnasiums in Dortmund.

Ab Sommersemester 1963 studierte ich an der Universität München Medizin. 1964 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und 1965 die ärztliche Vorprüfung. 1968 heiratete ich den Dipl.-Chemiker Holger Tesmann.

